

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



LA ACTIVIDAD DE CATALASA DE *Nocardia*  
*brasiliensis* HUJEG-1 COMO FACTOR DE VIRULENCIA  
EN EL MICETOMA EXPERIMENTAL

Por  
ERNESTO TORRES LOPEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR  
EN CIENCIAS con especialidad en Inmunología

NOVIEMBRE DE 2001

ERNESTO TORRES LOPEZ

TD  
Z6658  
FM  
2001  
.T6

2001



1020147522

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



LA ACTIVIDAD DE CATALASA DE *Nocardia*  
*brasiliensis* HUJEG-1 COMO FACTOR DE VIRULENCIA  
EN EL MICETOMA EXPERIMENTAL

Por  
ERNESTO TORRES LOPEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR  
EN CIENCIAS con especialidad en Inmunología



NOVIEMBRE DE 2001

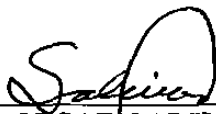
D  
M  
20



FONDO  
TESIS

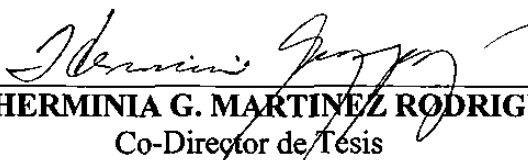
**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA DE *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1  
COMO FACTOR DE VIRULENCIA EN EL MICETOMA EXPERIMENTAL**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DR. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA**  
Director de Tesis



---

**DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ**  
Co-Director de Tesis



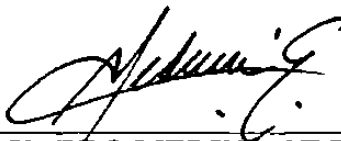
---

**DR. OLIVERIO WELSH LOZANO**  
Comisión de Tesis



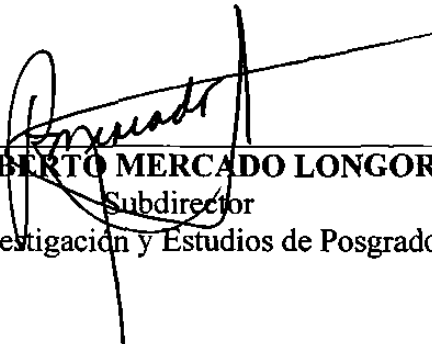
---

**DR. MARIO ALBERTO GARZA ELIZONDO**  
Comisión de Tesis



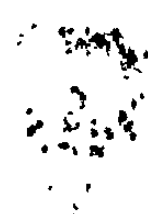
---

**DR. CARLOS EDUARDO MEDINA DE LA GARZA**  
Comisión de Tesis



---

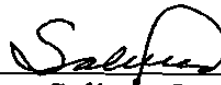
**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado



**LA ACTIVIDAD DE CATALASA DE *Nocardia brasiliensis*  
HUJEG-1 COMO FACTOR DE VIRULENCIA EN EL  
MICETOMA EXPERIMENTAL**

Presentado por: Q.C.B. y M.C. Ernesto Torres López

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología y la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L, bajo la Dirección General del Dr. Mario César Salinas Carmona y la Co-Dirección de la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez. Apoyado parcialmente por CONACYT# 25653-M y la Universidad Autónoma de Nuevo León, PAICYT # SA42500, parte del trabajo se desarrolló con el Ph. D Ying Zhang, del Laboratorio de Micobacterias del Molecular Microbiology and Immunology Department, Hygiene and Health Public School, Johns Hopkins University, Baltimore MD, EUA.



---

Dr. Mario César Salinas Carmona  
Director General de Tesis

## DEDICATORIA

Este trabajo de Tesis Doctoral, el cual está elaborado con gran esfuerzo, además de la gran pasión que siento por mi profesión, se lo brindo con respeto a mi Maestro

*DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA*

Agradezco con este presente mi formación en el campo de la Inmunología, recibiendo al mismo tiempo el ejemplo para emprender un camino en el área de la investigación.



## AGRADECIMIENTOS

Por siempre dejarme ser, por permitir llegar a este tiempo y en este momento, por tocar mi cara con su tersa mano y por darme la confianza de estar siempre a su lado.....Gracias **DIOS PADRE**.

A mi Jefe el Dr. Mario César Salinas Carmona, por darme la gran oportunidad para cumplir con esta meta.

A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez, de quien sin temor a equivocarme elegí para mi Co-Director de tesis y permitió que fuera un hijo más de Mine, además me formó como persona e hizo de mi un mejor profesional, por sus consejos y aportaciones para mi crecimiento muchas gracias.

Al Dr. Mario Alberto Garza Elizondo, por ser un ejemplo a seguir en el campo profesional, gracias por brindarme su amistad y confianza.

Al Dr. Oliverio Welsh Lozano, por sus aportaciones y observaciones en la escritura de este trabajo de Tesis.

Al Dr. Carlos E. Medina de la Garza, de quien representa el prototipo ideal de un excelente maestro y mucho mejor como amigo.

Al Dr. Jesús Ancer , Director de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la UANL, por apoyar mi formación.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña por su confianza y permitir realizar una parte de mi trabajo en la ULIEG.

Al Ph. D Ying Zhang, Sun y Alain, por recibirme en su laboratorio y enseñarme a jugar en las ligas mayores de la investigación, siempre estaré agradecido and always try again.

Al Molecular and Immunology Department de la Hygiene and Health Public School, Jonhs Hopkins University, Baltimore MD. EUA. Thank's a lot.

A la Ph. D. Brigitte Saint-Jones del Instituto Pasteur en Francia, por donarme gentilmente el vector pKAT-G, con el gen que codifica para la catalasa de *M. tuberculosis*. Gracias.

Con mucho respeto al Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla (†) y Dr. José W. Bustos (†), quienes fueron pioneros en que llegara este momento, donde se encuentren GRACIAS.

A mis amigos de trabajo Q.C.B Rosario Torres, Dr. Ricardo Salazar y Dr. Martín Canizales, de quienes agradezco infinitamente el apoyo que me brindaron.

A la Dra. Alma Yolanda Arce, Dra. Ma. Del Socorro G. Flores y Dra. Alma Isabel Ramos Cano, de quienes sin darse cuenta han sumado puntos a mi formación

A la Sra. Aracely del Socorro Sandoval y Sra. Irasema Lizzy de la Peña, quien en los últimos dieciocho años hemos compartido juntos las hieles y las mieles de la vida, muchas gracias por su apoyo, confianza y amistad.

A la Sra. Carmelita O. Cantú y Srta. Brenda, por brindarme su tiempo, muchas gracias.

Al Sr. Reynaldo Rodríguez, Sr. Francisco Esparza, Sr. Carlos Reyna y T.L.C. Alejandro Torres del Departamento de Inmunología, a quien agradezco infinitamente la confianza que me han brindado así como su amistad.

A Normita y Paty, por su apoyo incondicional en las oficinas administrativas de la Escuela de Postgrado. Gracias.

A mis compañeros de estudio Dra. Angeles Castro C. y Biólogo Juan Manuel Zúñiga, por sus críticas y observaciones en la elaboración de mi Tesis.

A *mis amigas en la ULIEG*, MC Alma Rosa y MC Dolores Esquivel, gracias por compartir sus conocimientos y los buenos tiempos de estudiantes.

Al MVS. Miguel Cantú, Lic. Mario C. González Treviño y L.A.E. Mario Ayala López, por conocer y aplicar en mi persona la sabia virtud de la amistad.

A José Luis Pulido Ayala por que hemos crecido juntos.

A CONACYT por brindarme el apoyo económico para poder realizar mis estudios.

Al origen de mi existencia, mis padres el Sr. Juan Torres Garnica (†) y la Sra. María Elena López Degollado(†), a mis abuelos maternos Don Gilberto López López(†) y Sra. Carmen Degollado Gallardo(†), quienes se fueron con la confianza plena en su hijo, de poder realizar esta meta.

## INDICE GENERAL

CAPITULO		Página
	RESUMEN	xviii
1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	7
	2.1 Generalidades	7
	2.1.1 Características microbiológicas	7
	2.1.1.1 Condiciones de crecimiento de <i>N. brasiliensis</i>	7
	2.1.1.2 Fermentación de azúcares	8
	2.2 Infección (Micetoma).	9
	2.2.1 Etiología del Micetoma.	9
	2.2.1.1 Incidencia	11
	2.2.2 Diagnóstico de la infección	11
	2.2.2.1 Diagnóstico serológico	11
	2.2.2.2 Factores de virulencia	16
	2.3 Histopatología del Micetoma	17
	2.3.1 Lesión brasiliensis	18
	2.4 Respuesta Inmune.	18
	2.4.1 La respuesta inmune celular en respuesta a la infección por <i>N. brasiliensis</i> .	18
	2.4.1.1 Transferencia pasiva de inmunidad específica para <i>N. brasiliensis</i> .	20
	2.4.2 La respuesta inmune humoral en respuesta a la infección por <i>N. brasiliensis</i>	20
	2.4.2.1 Anticuerpos protectores en respuesta a la infección por <i>N. brasiliensis</i> .	21

CAPITULO	Página
2.5 Actividades enzimáticas como factores de virulencia.	22
2.5.1 Actividad de catalasa.	27
2.5.2 Clasificación de las catalasas	28
2.5.2.1 Catalasas/peroxidasas o HPI.	29
2.5.2.2 Catalasas verdaderas o HPII.	29
2.5.2.3 Catalasas dependientes de Mn.	29
3 HIPOTESIS	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo principal	36
4.2 Objetivos específicos	37
5 MATERIAL Y METODOS	38
5.1 Material Biológico	38
5.1.1 Ratones BALB/c	38
5.1.2 Cepas Bacterianas	39
5.1.2.1 <i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1	39
5.1.2.2 Clonas mutadas de <i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1	39
5.1.2.3 <i>E. coli</i> XL-1 Blue.	39
5.1.3 pKAT-G.	40
5.1.4 Enzimas de restricción.	40
5.2 Reactivos	41
5.3 Equipo.	41
5.4 Material para la obtención de la sonda y marcaje radioactivo.	42
5.5 Material de vidrio y desechable.	42
5.6 Métodos	42
5.6.1 Preparación de <i>E. coli</i> XL-1 Blue calcio competentes	42

5.6.2 Preparación de células electrocompetentes	43
5.6.3 Obtención de inóculo infectante	43
5.6.4 Obtención de la LD <sub>80</sub> del EMS.	44
5.6.5 Actividad de catalasa	46
5.6.5.1 Método directo	46
5.6.5.2 Identificación de la actividad de catalasa y peroxidasa en gel de poliacrilamida.	46
5.6.5.2.1 Preparación del gel de poliacrilamida en condiciones nativas.	46
5.6.5.2.2 Obtención de extractos proteicos	47
5.6.5.2.3 Condiciones de corrimiento electroforético e identificación de la actividad de catalasa y peroxidasa en gel de poliacrilamida.	47
5.6.5.3 Determinación cuantitativa de la actividad de catalasa por espectrofotometría.	49
5.6.6 Transformación bacteriana.	50
5.6.6.1 Transformación de <i>E. coli</i> XL-1 Blue con pKAT-G.	50
5.6.6.2 Obtención de DNA plasmídico (Método alcalino).	51
5.6.6.3 Caracterización enzimática de pKAT-G.	52
5.6.7 Transformación con pKAT-G de una clona de <i>N. brasiliensis</i> catalasa negativa no inductora de Micetoma.	54
5.6.7.1 Transformación de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 mutada.	54
5.6.7.2 Eficiencia de transformación	55
5.6.7.3 Aislamiento de clonas transformadas con pKAT-G	55
5.6.7 Determinación de actividad de peroxidasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	56
5.6.8.1 Determinación de actividad de peroxidasa en gel poliacrilamida.	56
5.6.8.2 Determinación de actividad de peroxidasa en tubo.	56

## CAPITULO

## Páginas

5.6.9 Inducción del micetoma experimental en ratones BALB/c.	56
5.6.10. Construcción de una biblioteca genómica de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	58
5.6.10.1. Obtención y Purificación de PUC-18.	58
5.6.10.2. Obtención de fragmentos de DNA genómico de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	58
5.6.10.3. Clonación de fragmentos de DNA de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	59
5.6.10.4. Transformación de <i>E. coli</i> XL-1 Blue con DNA genómico de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 clonado en PUC-18.	60
5.6.10.5. Tamizaje de la biblioteca genómica de <i>N. brasiliensis</i> con KAT-G de <i>M. tuberculosis</i> .	61
5.6.10.5.1. Obtención de la sonda.	61
5.6.10.5.2. Marcaje de la sonda.	61
5.6.10.5.3. Hibridación <i>in situ</i> .	62
5.6.11. Southern-blot para el DNA genómico de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	63
5.6.11.1. Obtención del DNA genómico de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	63
5.6.11.2. Digestión del DNA genómico de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	64
5.6.11.3. Transferencia de los productos de digestión a papel de nitrocelulosa (PNC).	65
5.6.11.4. Hibridación de los productos de digestión con la sonda KAT-G de <i>M. tuberculosis</i> .	66
5.6.11.4.1. Pre-hibridación.	66
5.6.11.4.2. Hibridación con KAT-G marcado ( $\alpha^{32}\text{P}$ )	66
5.6.11.5. Autorradiografía	67
5.6.12. PCR para KAT-G de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	67

CAPITULO	Página
6. RESULTADOS	70
6.1. Obtención de clonas mutadas de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 no inductoras de micetoma	70
6.1.1. Viabilidad de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 al EMS	70
6.1.2. Evaluación de la capacidad de inducir micetoma por clonas mutadas catalasa negativa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	73
6.1.3. Evaluación de la capacidad de inducir micetoma por clonas mutadas de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 con diferentes actividades enzimáticas de la catalasa y/o proteasa.	75
6.2. Determinación cualitativa de la actividad de catalasa en clonas mutadas de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	75
6.2.1. Resultados de la actividad de catalasa por el método directo.	75
6.2.2 Determinación espectrofotométrica de la actividad de catalasa en clonas mutadas de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	77
6.2.3. Actividad enzimática de catalasa en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes.	79
6.3. Transformación de clonas mutadas de <i>N. brasiliensis</i> con pKAT-G	80
6.3.1 Transformación de <i>E. coli</i> con pKAT-G	80
6.3.2. Caracterización de pKAT-G	80
6.3.3. Transformación de una clona mutada (Nb-C68) de <i>N. brasiliensis</i> con pKAT-G.	82
6.3.4. Obtención de DNA plasmídico de clonas transformadas de Nb-C68 con pKAT-G	82
6.3.5. Caracterización del DNA plasmídico obtenido de una clona transformada de <i>N. brasiliensis</i> (Nb-C68T4).	83
6.4 Actividad de catalasa de las clonas Nb-C68 transformadas con pKAT-G.	84

CAPITULO	Página
6.4.1. Actividad de catalasa directa	84
6.4.2 Actividad de catalasa en gel de poliacrilamida	84
6.4.3 Actividad de catalasa por espectrofotometría	86
6.4.4 Actividad de peroxidasa en <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	87
6.5 Inducción de micetoma por clonas Nb-C68 transformadas con pKAT-G	90
6.6. Southern-blot para la identificación del gen que codifica para la catalasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	94
6.6.1 Obtención de una secuencia nucleotídica que codifica para la catalasa de <i>M. tuberculosis</i>	94
6.6.2. Digestión del DNA genómico de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 con las enzimas <i>Kpn</i> I, <i>Pst</i> I y <i>Bam</i> HI	94
6.6.3 Autorradiografía	95
6.7. Construcción de una biblioteca genómica de <i>N. brasiliensis</i> .	97
6.7.1 Obtención y purificación de PUC-18	97
6.7.2. Digestión parcial del DNA genómico de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	97
6.7.3. Reacción de ligación con T4 DNA ligasa	98
6.7.4. Tamizaje de la Biblioteca genómica de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 con KAT-G $\alpha^{32}\text{P}$	100
6.8. Amplificación por PCR del KAT-G de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	102
 7. DISCUSION	 103
 8. CONCLUSIONES	 118
 9. BIBLIOGRAFÍA	 119
 APÉNDICE	 145



## LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA 1 Criterios de evaluación del micetoma experimental en ratones BALB/c	12
TABLA 2 Enzimas reportadas en el género <i>Nocardia</i>	17
TABLA 3 Digestión enzimática de pKAT-G	53
TABLA 4 Digestión enzimática del DNA genómico de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	64
TABLA 5 Protocolo de reacción para la amplificación de KAT-G por PCR	68
TABLA 6 Condiciones de PCR	69
TABLA 7 Valores porcentuales de bacterias sobrevivientes de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 tratadas con diferentes dosis de EMS.	71
TABLA 8 Evaluación clínica del micetoma en ratones BALB/c por clonas mutadas de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 con EMS.	74
TABLA 9 Inducción de micetoma por clonas mutadas de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 con diferentes actividades enzimáticas.	76
TABLA 10 Determinación de actividad de catalasa en extractos proteicos de clonas mutadas de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 no inductoras de micetoma	78

TABLA 11	Actividad de catalasa de <i>Nb-C68</i> transformada con pKAT-G	88
TABLA 12	Evaluación de la inducción de micetoma por clonas transformadas de <i>N. brasiliensis</i> con pKAT-G	93

## LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Mapa de restricción de pKAT-G	40
FIGURA 2	Curva de viabilidad de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 Tratada con EMS.	72
FIGURA 3	Actividad de catalasa en gel de poliacrilamida al 12% no desnaturalizante.	79
FIGURA 4	Caracterización enzimática de pKAT-G.	81
FIGURA 5	Obtención de DNA plasmídico de clones Nb-C68 transformada con pKAT-G.	83
FIGURA 6	Determinación cualitativa de la actividad de catalasa directa.	85
FIGURA 7	Determinación de la actividad de catalasa en gel de poliacrilamida.	86
FIGURA 8	Reacción de la peroxidasa.	89
FIGURA 9	Cojinete plantar de la pata de un ratón BALB/c Infectado con <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	91
FIGURA 10	Cojinete plantar de la pata posterior de un ratón BALB/c infectado con Nb-C68.	92
FIGURA 11	Southern-blot para el DNA genómico de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	96
FIGURA 12	Biblioteca genómica, reacción de ligación.	99

		Página
FIGURA 13	Autorradiografía de recombinantes KAT-G <sup>+</sup> (Tamizaje de la biblioteca genómica)	101
FIGURA 14	Amplificación por PCR del KAT-G de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	102

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CDC	Control Disease Center (Centro de Control de Enfermedades.
°C	Grados Celsius
DBA	3',3' diaminobencidina
DNA	Ácido desoxorribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa
DO	Densidad óptica
dNTPs	Desoxinucleosido trifosfato
EMS	Etilmetanosulfonato
ELISA	Enzyme Ligand Immunoassay
FeCl <sub>3</sub>	Cloruro férrico
g	Gramos
h	Hora
HPI	Hidroxiperoxidasa tipo I
HPII	Hidroxiperoxidasa tipo II
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
INF-γ	Interferón tipo γ
IgG3	Inmunoglobulina isotipo G, subtipo 3
IgM	Inmunoglobulina isotipo M
INH	Isoniazida
KAT-G	Gen que codifica para las catalasas/peroxidases
KAT-E	Gen que codifica para las catalasas
Kb	Kilobases
Kd	Kilodaltons
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Ferricianuro de potasio
KV	Kilovoltios
LB	Linfocito B
LB-agar	Luria Bertani-Agar
LD <sub>80</sub>	Dosis letal al 80%
Log	Logaritmo
LT	Linfocito T
μCi	Microcurie

μg	Microgramos
μL	Microlitros
M	Molar
mCi	Milicurie
Mg	Manganeso
min	Minuto (s)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MNP	ρ-nitrofenilen-α-D-manopyranosido
Nb	<i>Nocardia brasiliensis</i>
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
PNC	Papel de Nitrocelulosa
PMN	Polimorfonucleares
%	Por ciento
pH	Potencial de hidrógeno
P	Proteína
NO•	Radical de óxido nítrico
O <sub>2</sub> •	Radical superóxido
OH•	Radical hidroxilo
PBS	Amortiguador salina fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p/v	Relación peso volumen
PYR	L-pyrrodinóil-β-naftilamide
Redox	Reacción de óxido-reducción
RH <sub>2</sub>	Radical unido a un mol de hidrógeno
RNAsa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SOD	Superóxido dismutasa
SOD-A	Superóxido dismutasa tipo A
SOD-B	Superóxido dismutasa tipo B
SSC	Solución salina citratos
TE	Tris-etilen diaminotetra acético
UFC	Unidades formadoras de colonias
U	Unidades
U/mg	Unidades por miligramo
U/mL	Unidades por mililitro
UV	Luz ultravioleta

V	Voltios
v/v	Relación volumen/volumen
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-galactosido
$\approx$	Aproximadamente

## RESUMEN

**Ernesto Torres López Fecha de Obtención del Grado: Noviembre del 2001**

**Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina**

**Título del Estudio: LA ACTIVIDAD DE CATALASA DE *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 COMO FACTOR DE VIRULENCIA EN LA INDUCCIÓN DEL MICETOMA EXPERIMENTAL.**

**Número de Páginas: 154**

**Candidato al Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Inmunología.**

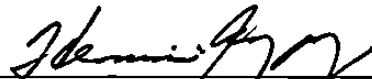
**Area de Estudio: Inmunología.**

**Propósito y Método de estudio:** *N. brasiliensis* HUJEG-1 produce una proteína inmunodominante (P61) con actividad de catalasa de la cual se desconoce su participación en la inducción del micetoma o su posible papel como factor de virulencia. El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en la inducción del micetoma experimental en ratones BALB/c. Para realizar este estudio partimos de una cepa de referencia inductora de micetoma (HUJEG-1, ATCC #700358), tratada con un mutágeno químico (etilmetano sulfonato) y se aislaron clonas no inductoras de micetoma catalasa negativa, de estas se seleccionó una clona para restaurar por transformación, la actividad de catalasa con un vector portador del gen de la catalasa de *Mycobacterium tuberculosis* (KAT-G), se detectó la restauración de la actividad de catalasa en clonas transformadas y estudiamos la inducción del micetoma en ratones BALB/c. Finalmente tratamos de aislar el gen de catalasa de *N. brasiliensis* con una sonda obtenida del gen que codifica para la catalasa de *M. tuberculosis*.

**Contribuciones y Conclusiones:** Después del tratamiento con etilmetano sulfonato logramos obtener una clona de *N. brasiliensis* catalasa negativa y no inductora de micetoma en ratones BALB/c. Posteriormente transformamos una clona por electroporación con pKAT-G de *M. tuberculosis*. La restauración de la actividad de catalasa en la clona mutada no restauró la inducción de micetoma cuando los ratones BALB/c fueron infectados con clonas KAT-G positivas. En este trabajo se determinó que P61 es una proteína bifuncional con actividad de catalasa y peroxidasa, por lo cual es una proteína codificada por el gen KAT-G de *N. brasiliensis*. Finalmente el análisis por Southern-blot, tamizaje de una biblioteca genómica y análisis por PCR para la búsqueda del gen de la catalasa de *N. brasiliensis* con una sonda obtenida del gen KAT-G de *M. tuberculosis*, sugieren que no existe homología entre estos dos genes. Con estos experimentos parece ser que la actividad de catalasa no es un factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental.



**Dr. Mario Cesar Salinas Carmona**  
Director general de Tesis



**Dra. Herminia G. Martínez Rdz.**  
Co-Director de Tesis